

12/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

004762194

WPI Acc No: 1986-265535/198641

XRAM Acc No: C86-114893

**Ubiquinone-10 prodn. from acetobacter strains - by continuous culture on**

**methanol as carbon and energy source and isolation of ubiquinone-10 from**

**resulting biomass**

Patent Assignee: AKAD WISSENSCHAFTEN DDR (DEAK )

Inventor: ISKE U; VOIGT B; WORBS M

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DD 236552	A	19860611	DD 275600	A	19850426	198641 B

Priority Applications (No Type Date): DD 275600 A 19850426

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DD 236552	A	5		

Abstract (Basic): DD 236552 A

In a new process for the prodn. of ubiquinone 10 of formula (I),  
biomass of a bacterium strain of the genus Acetobacter is produced in  
continuous culture on methanol as carbon- and energy source and the  
ubiquinone 10 is recovered from the biomass in a conventional  
manner,  
either immediately or following a prod.-formation phase.

USE/ADVANTAGE - Ubiquinones (particularly ubiquinone 10), which  
exert coenzymatic activity in the electron transport system of the  
respiratory cycle, have various pharmacological activities. Thus,  
effects are observed in congestive heart failure, coronary  
insufficiency, and in muscular dystrophy and anaemia due to dietary  
deficiency. (Corrected abstract) (5pp Dwg.No.0/0)

Title Terms: UBIQUINONE; PRODUCE; ACETOBACTER; STRAIN; CONTINUOUS;  
CULTURE;

METHANOL; CARBON; ENERGY; SOURCE; ISOLATE; UBIQUINONE; RESULT;  
BIOMASS

Derwent Class: B05; D16

International Patent Class (Additional): C07D-207/08; C07D-487/04;  
C12P-007/66

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C1; B10-A06; B12-C10; B12-F01B; B12-H01;  
D05-C03A

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* G018 G100 H5 H542 H7 H723 H8 K0 L9 L951 M210 M211 M226 M232 M240  
M272 M282 M320 M414 M510 M520 M531 M540 M720 M903 N131 N425 N513  
P522 P811 P812 Q233 V0 V801

?

DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **236 552 A1**

4(51) C 12 P 7/66

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) W P C 12 P / 275 600 1

(22) 26.04.85

(44) 11.06.86

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD

(72) Voigt, Beate, Dr. rer. nat.; Worbs, Martin, Dipl.-Chem.; Iske, Uwe, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Ubichinon-10

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Ubichinon-10. Erfindungsgemäß wird Biomasse eines Bakterienstammes der Gattung *Acetobacter*, vorzugsweise ein Species des Stammes *Acetobacter methanolicus*, hinterlegt am ZIMET Jena unter der Bezeichnung IMET B346, auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequellen in kontinuierlicher, unsteriler Kultur erzeugt und das Ubichinon-10 unmittelbar oder im Anschluß an eine Produktionsbildungsphase aus der Biomasse in bekannter Weise gewonnen.

ISSN 0433-6461

5 Seiten

**Erfindungsanspruch:**

1. Verfahren zur Herstellung von Ubichinon—10, **dadurch gekennzeichnet**, daß Biomasse eines Bakterienstammes der Gattung *Acetobacter* auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle in kontinuierlicher Kultur erzeugt wird und daß Ubichinon—10 entweder unmittelbar oder im Anschluß an eine Produktbildungsphase aus der Biomasse in bekannter Weise gewonnen wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Bakterien eines Stammes von *Acetobacter methanolicus*, hinterlegt am ZIMET Jena unter der Bezeichnung IMET B 346, verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Kultivierung vorzugsweise bei maximaler Wachstumsgeschwindigkeit unter N-Limitation durchgeführt wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß methanolhaltige Abwässer als Kohlenstoffquelle verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor der Isolierung von Ubichinon—10 die Biomasse zur Gewinnung von Glukonsäure benutzt wird.

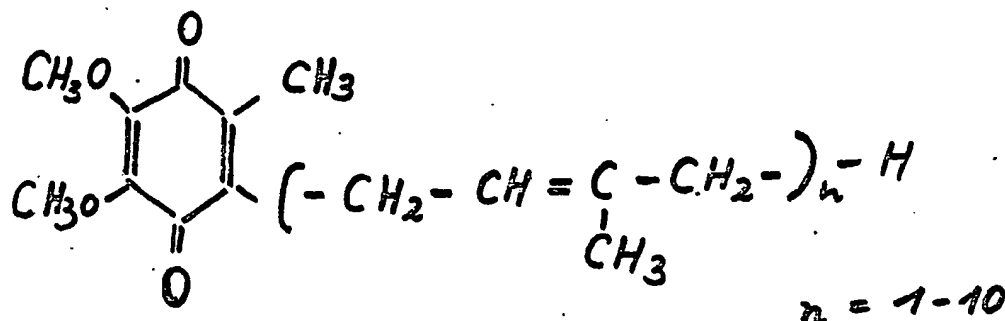
Hierzu 1 Seite Formeln

**Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Ubichinon—10.

**Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

Ubichinone sind 2,3-Dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinone, die in 6-Stellung des Chinonrings eine Isoprenseitenkette enthalten und durch die allgemeine Formel



dargestellt werden können. Die Erfindung betrifft die Herstellung von Ubichinon der angegebenen Formel, wobei n die Zahl 10 bedeutet.

Für die Ubichinone, die coenzymatische Aktivität im Elektronentransportsystem der Atmungskette aufweisen, wurden zahlreiche pharmakologische Wirkungen gefunden. So wurden beispielsweise bemerkenswerte Effekte auf das Kongestions-Herzversagen, die Coronarinsuffizienz, die durch Fehlernährung verursachte Muskeldystrophie und Anämien nachgewiesen. Insbesondere wird Ubichinon—10 als höchst wertvolles Arzneimittel angesehen, da das im Menschen vorkommende Ubichinon das Ubichinon—10 ist.

Es ist bekannt, daß für die Gewinnung von Ubichinon—10 auch mikrobielle Biomassen genutzt werden. Die Zahl der Mikroorganismen, die Ubichinon—10 enthalten, ist jedoch verhältnismäßig gering. In US-PS 1.343.066 wird beschrieben, daß einige Stämme der Gattungen *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Rhodospiridium*, *Trichosporon*, *Aureobasidium*, *Tremella*, *Bullera* und *Alcaligenes* zur Bildung von Ubichinon—10 fähig sind, wenn sie auf Kohlehydraten, organischen Säuren oder Alkoholen als Kohlenstoffquelle kultiviert werden. Der in den Biomassen analytisch bestimmte Ubichinon—10-Gehalt liegt jedoch mit 60 bis 480 µg/g Trockensubstanz im Hinblick auf eine ökonomisch effektive Gewinnung extrem niedrig. Wesentlich höhere Ubichinon—10-Gehalte wurden bei einem Stamm der Gattung *Trichosporon* nach Kultivierung auf Sulfitablauge mit 840 µg/g (DE-OS 2938377) oder bei dem Stamm *Microcycus methanolicus* nach Kultivierung auf Methanol mit 1000 µg/g (JP-PS 54—119079) gefunden. Jedoch konnte auch hier die Ubichinonausbeute bezogen auf die Zellkonzentration mit 9,4 mg/l bzw. 10 mg/l nicht befriedigen.

Wiederholt wurde versucht, die Ausbeute an Ubichinon—10 durch Einsatz von Präkursoren zu verbessern. So werden in US-PS 4.220.719 Isopentylalkohol und in DE-OS 2838252 Isopentenylalkohol, Dimethylallylalkohol, Geraniol, Isopentenylacetat, Dimethylallylacetat, Geranylacetat, β-Methylcrotonsäure bzw. in US-PS 4.070.244 und US-PS 4.367.289 p-Hydroxybenzoesäure dem Nährmedium zugegeben. Die durch die Zugabe der Präkursoren erzielten Erhöhungen des Ubichinongehaltes betragen im Durchschnitt 20–30%. Nachteilig ist dabei, daß die Bereitstellung der chemisch kompliziert zusammengesetzten Präkursoren einen zusätzlichen präparativen und ökonomischen Aufwand erfordert.

In JP-PS 55—26 wird weiterhin berichtet, daß aus der Gattung *Agrobacterium* eine Mutante erzeugt und isoliert werden konnte, bei deren Kultivierung eine Ubichinon—10-Akkumulation von 57,8 mg/l erreicht wurde. Derartige Mutanten weisen jedoch den entscheidenden Nachteil auf, daß sie sich nicht oder nur schwierig für kontinuierliche Fermentationen nutzen lassen. Der Mehrzahl der diskutierten Verfahren haftet als weiterer Nachteil an, daß die Kultivierung unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden muß.

## Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist ein Verfahren, das die mikrobielle Herstellung von Ubichinon—10 kostengünstig bei minimalem Hilfsstoffverbrauch und Arbeitsaufwand unter kontinuierlichen Fermentationsbedingungen in einem unsterilen Prozeß ermöglicht.

## Darstellung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, Ubichinon—10 mikrobiell in kontinuierlicher Kultur mit hoher Raum-Zeit-Ausbeute zu erzeugen.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß Biomasse eines Bakterienstammes der Gattung *Acetobacter* auf Methanol als Kohlenstoff- und Energiequelle in kontinuierlicher, unsteriler Kultur erzeugt wird und das Ubichinon—10 unmittelbar oder im Anschluß an eine Produktbildungsphase aus der Biomasse in bekannter Weise gewonnen wird.

Als Produktionskultur wird dabei vorzugsweise ein Species des Stammes *Acetobacter methanolicus*, hinterlegt am ZIMET Jena unter der Bezeichnung IMET B 346, verwendet. Die Kultivierung im kontinuierlichen Prozeß erfolgt mit möglichst hoher Durchflußrate im Bereich der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit der Mikroorganismen und unter den Bedingungen der Stickstofflimitation. Als Kohlenstoff- und Energiequelle für das Organismenwachstum können neben reinem Methanol organisch hochbelastete, methanolhaltige technische Ab- und Nebenprodukte, wie sie z. B. in den verschiedensten Prozeßstufen der chemischen Industrie anfallen, als alleiniges Substrat oder in Mischung mit Methanol genutzt werden. Dadurch ist neben einer signifikanten Senkung der Rohstoffkosten eine Reduzierung der Umweltbelastung erreichbar. Der kontinuierliche Kultivierungsprozeß verläuft auch unter unsterilen Bedingungen außerordentlich stabil. Die Ausbeuten von  $> 100 \text{ g/m}^3$  bzw.  $12,5 \text{ g/m}^3 \cdot \text{h}$  übertreffen die bisher in der Patentliteratur angeführten Höchstwerte für Ubichinon—10 beträchtlich.

Überraschenderweise bleibt die hohe Konzentration an Ubichinon—10 in der Biomasse erhalten, wenn die Mikroorganismen vor der Ubichinonabtrennung zur mikrobiellen Produktsynthese, z. B. zur Gewinnung von Glukonsäure aus Glukose, genutzt werden.

Für die Isolierung von Ubichinon—10 können üblicherweise eingesetzte Verfahren zur Anwendung kommen. Dabei wird aus der getrockneten Biomasse mit einem Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch, beispielsweise Aceton/Wasser, ein Lipidextrakt gewonnen. Ubichinon—10 kann aus dem Lipidextrakt nach bekannten Verfahren, beispielsweise Säulenchromatographie oder Verseifung und nachfolgende säulenchromatographische Abtrennung aus dem Unverseifbaren oder multiplikative Verteilung isoliert werden.

Das Verfahren gemäß der Erfindung wird durch folgende Beispiele erläutert:

### Beispiel 1

In einen Laborrührkesselfermentor von 12 l Bruttovolumen mit 6 Blattscheibenrührern werden 5 l eines Nährmediums folgender Zusammensetzung gegeben:

$\text{NH}_2\text{Cl}$	2 g/l	$\text{H}_3\text{BO}_3$	7,0 mg/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6 g/l	$\text{FeCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	4,2 mg/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,4 g/l	$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	7,2 mg/l
$\text{CaSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	2,4 mg/l	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	7,8 mg/l
$\text{CoSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,6 mg/l	$\text{ZnCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	6,0 mg/l
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	4,7 mg/l	Hefeextrakt	0,1 %

Dieses Nährmedium ermöglicht einen Organismenzuwachs von 5 g/l.

Nach Einstellen eines pH-Wertes von 4,1 durch verdünnte Schwefelsäure und einer Temperatur von  $32^\circ\text{C}$  wird das Fermentationsmedium mit der Kultur MB 58 IMET B 346 beimpft, so daß sich eine Startkonzentration von ca. 0,5 g Biomasse/l ergibt. Das Medium wird mit einer Belüftungsrate von 100 l/h begast und mit 1200 U/min gerührt. Durch Zusatz von 3 g Methanol/l wird der diskontinuierliche Wachstumsprozeß gestartet und die Methanolkonzentration anschließend durch kontinuierliche Zugabe im Bereich von 0,1–0,3 g/l Methanol gehalten.

Zur Regulierung des pH-Wertes wird 5%ige Natronlauge verwendet. Nach Erreichen einer Biomassekonzentration von ca. 5 g/l erfolgt der Übergang zur kontinuierlichen Prozeßführung mit einer Verweilzeit von 6,5 Stunden. Die im kontinuierlichen Prozeß eingesetzte Nährlösung ist bilanziert für einen Organismenzuwachs von 15 g/l. Der Prozeß wird so geführt, daß die Stickstoffkonzentration im Fermentationsmedium 10 mg/l nicht übersteigt. Ein weiterer Zusatz von Hefeextrakt im unsterilen kontinuierlichen Prozeß ist nicht erforderlich.

Bedingt durch die vorgegebene Nährstoffkonzentration wird im stationären Prozeßzustand eine Zellkonzentration von 15,8 g/l erreicht, entsprechend einer Produktivität von  $2,4 \text{ g Biomasse/l} \cdot \text{h}$  ( $\approx 2,6 \text{ mg Ubichinon—10/l} \cdot \text{h}$ ).

Die Ubichinon—10haltige Biomasse wird entweder direkt oder nach einer vorgeschalteten Separationsstufe durch Sprühtrocknung aus dem Fermentationsmedium gewonnen.

1 kg der getrockneten Biomasse wird 2mal mit je 3 kg Aceton/Wasser 9:1 bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Wasserstrahlvakuum wird der Extrakt mit 240 ml 10%iger methanolischer KOH und 40 ml 10%iger wäßriger Natriumdithionitlösung 45 Minuten am Rückfluß verseift. Nach Zugabe von 180 ml Wasser wird die Seifenlösung 3mal mit 250 ml n-Hexan extrahiert. Die vereinigten Hexanphasen werden mit Wasser neutral gewaschen und über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Nach Entfernen des n-Hexans wird der Rückstand aus Aceton umkristallisiert. Es werden 720 mg Ubichinon—10 erhalten.

**Beispiel 2**

Ein 2 m<sup>3</sup> Hochleistungs-IZ-Strahlreaktor wird mit 1,0 m<sup>3</sup> einer Nährlösung analog Beispiel 1, jedoch bilanziert für ein Organismenwachstum von 10 kg/m<sup>3</sup>, beschickt und nach Einstellen der Prozeßparameter Temperatur (32°C) und pH-Wert (4,2) mit 1,5 kg/m<sup>3</sup> der Kultur MB 58 IMET B 346 beimpft. Durch kontinuierliche Zuführung von Methanol als Kohlenstoffquelle analog Beispiel 1 wird der Fermentationsprozeß unsteril gestartet und bis zu einer Konzentration von ca. 10 kg Biomasse/m<sup>3</sup> geführt. Danach erfolgt nach dem Prinzip der Fed-batch-Kultivierung die kontinuierliche Dosierung eines Nährlösungskonzentrates bilanziert für ein Organismenwachstum von ca. 350 kg/m<sup>3</sup> sowie von Methanol entsprechend der Substratverbrauchskoeffizienten. Zur Verbesserung der Sauerstoffübertragungsleistung wird der Reaktor mit einem Systemdruck bis max. 1,0 MPa betrieben. Bei Erreichen einer Zellkonzentration von etwa 70 kg/m<sup>3</sup> wird zur kontinuierlichen Prozeßführung mit einer Verweilzeit von 10 Stunden und einem Reaktorvolumen von 1,2 m<sup>3</sup> übergegangen. Die eingesetzte Nährlösung ist bilanziert für 110 g Biomassezuwachs. Im stationären Prozeßzustand wird eine aktuelle Zellkonzentration von 104 kg/m<sup>3</sup> entsprechend einer Produktivität von 10,4 kg/m<sup>3</sup> · h erreicht.

Zur Reduzierung der Salzbelastung wird eine stickstofffreie Nährlösung verwendet. Der für das Organismenwachstum benötigte Stickstoff wird dem Prozeß über die pH-Regelung in Form einer Ammoniaklösung zugeführt, so daß die aktuelle Stickstoffkonzentration den Bereich 0–15 mg nicht überschreitet.

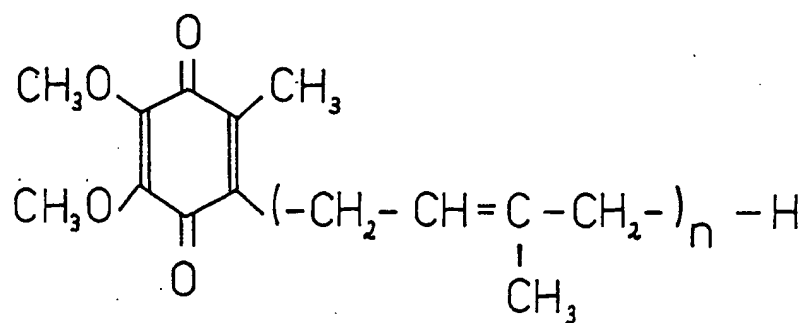
Die Ubichinon—10haltige Biomasse wird ohne Vorbehandlung durch Sprühtrocknung gewonnen und analog Beispiel 1 aufgearbeitet.

Der Ubichinongehalt der Biomasse beträgt 1,2 mg/g entsprechend einer Produktbildungsrate von 12,5 g Ubichinon—10/m<sup>3</sup>h.

**Beispiel 3**

In einem 12 l Rührkesselreaktor wird analog Beispiel 1 Biomasse der Kultur MB 58 IMET B 346 im kontinuierlichen Prozeß kultiviert. Aus dem Fermentationsmedium wird durch Separation eine Biomassesuspension mit einer Konzentration von 130 g/l gewonnen. Mit dieser Suspension wird ein 250 l Rührkesselreaktor mit 150 l einer 15%igen Glukoselösung beimpft, so daß sich eine aktuelle Zellkonzentration von 8 g/l ergibt. Unter Belüften und Rühren wird die im Reaktor vorgegebene Glukose mikrobiell nach DD — WP 246334 quantitativ in Glukonsäure umgesetzt. Durch Zusatz weiterer Glukose wird der Prozeß so gesteuert, daß eine Endkonzentration von 300 g Glukonsäure/l Fermentationsmedium erreicht wird. Nach Beendigung des Produktbildungsprozesses erfolgt vor der Weiterverarbeitung des Fermentationsmediums zu Glukonsäure oder Glukonaten die Abtrennung des Produzenten entweder durch Flockung oder Separation bzw. eine Kombination beider Verfahren. Nach Trocknung der Ubichinon—10haltigen Biomasse erfolgt die Isolation und Gewinnung des Ubichinon—10 analog Beispiel 1 mit folgendem Ergebnis:

eingesetzte Biomasse	1,20 kg
rückgewonnene Biomasse	1,03 kg
Ubichinon—10-Gehalt	0,9 mg/g
Ubichinon—10 isoliert	690 mg



$n=1-10$